



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI CAGLIARI

FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA

Dipartimento di Scienze Biomediche e Biotecnologie

XX CICLO DOTTORATO DI RICERCA IN

TERAPIA PEDIATRICA E FARMACOLOGIA DELLO SVILUPPO

Identificazione e caratterizzazione del gene coinvolto  
nella  
Sindrome di Crisponi

Relatore:

**Prof. Antonio Cao**

Dottorando:

**Dott.ssa Alessandra Meloni**

Coordinatore Scientifico: **Prof. Renzo Galanello**

**Anno Accademico 2004-2007**

(Settore scientifico disciplinare di appartenenza MED/03)

*Bonum certamen certavi, cursum consummavi, fidem servavi*

(Paolo di Tarso)

# SOMMARIO

<b>1 INTRODUZIONE .....</b>	<b>4</b>
1.1 Definizione, sintomi ed epidemiologia della Sindrome di Crisponi .....	4
1.2 Peculiarità della popolazione Sarda .....	6
1.3 Caratteristiche cliniche .....	7
1.3.1 Fenotipo neonatale.....	7
1.3.2 Fenotipo evolutivo.....	7
1.4 Diagnosi differenziale della sindrome di Crisponi.....	8
1.4.1 Sindrome di Stuve –Wiedemann/Schwartz-Jampel tipo 2 (SWS/SJS2) .....	9
1.4.2 Cold-Induced Sweating Sindrome Tipo 1 (CISS1).....	10
1.4.3 Cold-induced sweating syndrome Tipo 2 (CISS2) .....	11
 <b>2 PROGETTO: Identificazione e caratterizzazione del gene coinvolto nella sindrome di Crisponi.....</b>	 <b>11</b>
2.1 Genotipizzazione del DNA .....	13
2.2 Mappaggio del gene <i>CRLF1</i> .....	14
2.3 Struttura ed espressione del gene <i>CRLF1</i> .....	16
2.4 Analisi mutazionale del gene <i>CRLF1</i> .....	17
2.5 Struttura della proteina CRLF1 .....	19
2.6 Ruolo della proteina CRLF1 .....	23
2.7 Analisi funzionale del CRLF1.....	25
2.7.1 Mutagenesi .....	25
2.7.2 Test secrezione .....	26

<b>3 RISULTATI E DISCUSSIONE .....</b>	<b>28</b>
<b>4 MATERIALI E METODI .....</b>	<b>31</b>
4.1 Estrazione del DNA.....	31
4.2 Genotipizzazione del DNA .....	31
4.3 Amplificazione del DNA e sequenziamento diretto.....	32
4.4 Mutagenesi .....	32
4.5 Trasfezioni.....	33
4.6 Western blotting .....	33
<b>5 PROSPETTIVE FUTURE .....</b>	<b>34</b>
5.1 Diagnosi molecolare e prenatale .....	34
5.2 Studio pilota per lo screening genetico della sindrome di Crisponi nella popolazione Sarda .....	34
5.3 Terapia farmacologica della sindrome di Crisponi .....	35
<b>6 CONCLUSIONI .....</b>	<b>35</b>
<b>7 RINGRAZIAMENTI .....</b>	<b>36</b>
<b>8 BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>38</b>

# **1 INTRODUZIONE**

## **1.1 Definizione, sintomi ed epidemiologia della Sindrome di Crisponi**

La Sindrome di Crisponi (MIM 601378) è una severa condizione autosomica recessiva descritta per la prima volta nel 1996 in 17 bambini, 8 maschi e 9 femmine provenienti da 12 famiglie Sarde (Crisponi G., 1996). Più recentemente sono stati riportati in letteratura altri due casi che presentano lo stesso fenotipo, e dagli autori è stato suggerito che la sindrome prendesse il nome dal medico che per primo la descrisse (Accorsi et al., 2003; Nannenberg et al., 2005). Il disordine è evidente fin dalla nascita ed è caratterizzato da marcate contrazioni dei muscoli facciali in risposta a stimoli tattili o durante il pianto, con trisma e abbondante salivazione che simula uno spasmo tetanico (Figura 1A). Sono state inoltre osservate contrazioni dei muscoli dell'oro-faringe associate all'assenza del riflesso della deglutizione, accompagnate da salivazione abbondante. Queste contrazioni lentamente scompaiono come il bambino si calma e non si manifestano durante il sonno. Tutti i pazienti presentano anomalie facciali, quali viso largo, guance paffute, naso marcato con narici anteverse (Figura 1A-D) e camptodattilia bilaterale (Figura 1F).

Il decorso clinico è caratterizzato da marcate difficoltà nella suzione alla nascita che richiedono l'utilizzo di un sondino nasogastrico. I pazienti inoltre vanno incontro a crisi di ipertermia, con temperature corporee intorno ai 38°C accompagnate da irregolari picchi febbrili che superano i 42°C, con esordio che va dalla nascita a poche settimane. Molti pazienti muoiono nei primi mesi di vita in seguito all'insorgenza di tali episodi.

Tutte le indagini di laboratorio eseguite non hanno fornito indicazioni utili per un inquadramento diagnostico. L'analisi del cariotipo è sempre risultata normale. La TAC e la risonanza magnetica non hanno evidenziato anomalie del Sistema Nervoso Centrale. Le numerose indagini eseguite per varie

malattie metaboliche sono risultate negative. Le analisi elettromiografiche sulla conduzione del nervo, e le biopsie muscolari esaminate con tecniche istologiche ed immunoistochimiche non hanno evidenziato anomalie. Gli esami colturali eseguiti durante gli episodi di ipertermia su sangue, liquor, urine e feci sono risultati ripetutamente negativi, così come gli indici di flogosi. Un basso livello di GABA (acido gamma aminobutirrico) nel liquor, riscontrato in un paziente, non è stato confermato in successive analisi su altri bambini affetti. I pazienti che sopravvivono di solito sviluppano una severa e progressiva cifoscoliosi (Figura 1E) che richiede l'uso del corsetto o il ricorso all'intervento chirurgico. Nei pazienti adolescenti esposti ad un ambiente freddo è stata inoltre osservata una sudorazione paradossa. E' inoltre presente un ritardo psicomotorio di variabile gravità.



**Figura 1. Aspetti clinici tipici della sindrome di Crisponi** (Ref. 17). 1, Soggetto CS07. 2, Soggetto CS10. 3, Soggetto CS14. 4, Soggetto CS03. 5, Soggetto CS37. A-D. Espressioni del viso a diverse età, dalla nascita ad oggi. E. Visione di fronte e di spalle, allo stato attuale. E' evidente la scoliosi e la limitata estensione dei gomiti. F. Si noti la consistente camptodattilia.

## **1.2 Peculiarità della popolazione Sarda**

Sebbene alcune malattie genetiche siano rare, esistono realtà geografiche e demografiche, come la Sardegna, in cui sono più diffuse. Questa regione, nella sua interezza, è stata a lungo considerata un “isolato genetico”. Il suo isolamento millenario, la crescita lenta della popolazione originatasi da pochi individui fondatori e la mancanza di flussi immigratori importanti, hanno fatto sì che gli abitanti attuali abbiano un patrimonio genetico più omogeneo rispetto a popolazioni allargate. Per tale ragione è stata oggetto di numerosi studi genetici, in particolare per alcune malattie monogeniche a trasmissione mendeliana, in cui l'individuazione della mutazione genica ha rivelato l'esistenza di un forte effetto “fondatore”. Mutazioni insorte anticamente e trasmesse alla progenie, si ritrovano oggi in famiglie apparentemente non imparentate, con una frequenza maggiore rispetto alle altre popolazioni, e ciò si manifesta con una più alta incidenza di malattie rare. L'isolamento che fino a ieri è stato considerato uno svantaggio, diventa oggi un formidabile strumento per la ricerca di geni implicati nello sviluppo di malattie, e la popolazione Sarda rappresenta perciò una ricchezza unica per tutta l'umanità.

Le patologie autosomiche recessive sono solitamente comuni in popolazioni omogenee che di conseguenza mostrano un incremento nella prevalenza di malattie rare: molte di queste si ritrovano negli ebrei Ashkenazi (malattia di Tay Sachs, malattia di Gaucher, Anemia di Fanconi, malattia di Niemann-Pick), negli Eschimesi Yupik (iperplasia adrenale congenita) e nella popolazione Sarda (talassemia beta e alfa). È interessante notare inoltre che molte delle patologie monogeniche in Sardegna, quali la talassemia, il morbo di Wilson e l'APECED, mostrano una omogeneità quasi totale nel repertorio degli alleli patogeni. La consanguineità può essere importante nelle malattie autosomiche recessive in quanto persone imparentate hanno più probabilità di avere lo stesso allele mutato. Gli eterozigoti per i geni di malattie recessive (portatori) sono di solito asintomatici ma l'identificazione del gene coinvolto può portare a individuare marcatori biochimici che permettono di valutarne lo stato. Per esempio nel caso di portatori talassemici, un'analisi ematologica che

comprende la determinazione della quantità e del tipo di emoglobine presenti e del numero e del volume di globuli rossi, permette di identificare e distinguere i portatori di talassemia beta da quelli portatori di talassemia alfa.

### **1.3 Caratteristiche cliniche**

Dei 22 casi affetti da sindrome di Crisponi descritti finora in Sardegna, solo 5 sono attualmente viventi, e in tutti è stato caratterizzato sia il fenotipo neonatale che quello evolutivo. Il fenotipo ed il decorso clinico della Sindrome di Crisponi può essere esemplificato dal seguente caso: il paziente CS07, un maschio nato alla 38° settimana di gestazione da due genitori sardi non imparentati tra loro.

#### **1.3.1 Fenotipo neonatale**

Il peso alla nascita era 3130 g (50°percentile), la lunghezza 48 cm (50°percentile). Subito dopo la nascita il bambino presentava difficoltà alla suzione e alla deglutizione ed aveva marcati spasmi dei muscoli mimici durante il pianto, con abbondante salivazione. Anomalie minori erano date da camptodattilia e naso grosso con narici anteverse. E' stata inoltre notata un'eccessiva risposta a stimoli sonori e tattili, con contrazioni spasmodiche dei muscoli del viso, della mascella e del collo, frequenti contrazioni dei muscoli oro-faringei associati all'assenza del riflesso della deglutizione, che ha richiesto l'utilizzo di un sondino nasogastrico. Dalle prime settimane di vita il paziente ha manifestato ipertermia non correlata ad agenti infettivi, associata a dispnea, brevi periodi di apnea e cianosi durante il pianto.

#### **1.3.2 Fenotipo evolutivo**

Almeno per i primi anni persistono la difficoltà nel nutrirsi, gli episodi febbrili, la contrattura durante il pianto, e successivamente insorgono altre caratteristiche quali la limitata estensione a livello del gomito, la cifoscoliosi, la ridotta lacrimazione con conseguente cheratite.



A sei anni iniziano gli episodi di sudorazione che comincia nella parte superiore delle labbra e nelle sopracciglia e si espande al torace e ai palmi delle mani che in seguito diventano fredde e cianotiche. Tutto ciò è provocato dall'esposizione ad una bassa temperatura ambientale e dall'aumento dell'umidità. Il paziente non tollera il calore, vive in una casa con l'aria condizionata ad una temperatura controllata e costante sia d'estate che d'inverno. Durante un test del sudore, dopo il passaggio da un ambiente caldo ad un ambiente più freddo, con temperatura di 22°C si è evidenziata sudorazione localizzata intorno alle sopracciglia e alle labbra, seguita da una leggera sudorazione nella zona delle spalle.

La sopravvivenza in pazienti affetti dalla sindrome è possibile (5/22) e la prognosi migliora dopo il primo anno di vita nonostante alcuni sintomi quali l'ipertermia, la difficoltà nell'alimentazione, la contrattura nel pianto persistano per qualche anno, e ne insorgano altri quali il reflusso gastro-esofageo, la cifoscoliosi, la ridotta lacrimazione con conseguente cheratite, l'intolleranza al calore e la sudorazione paradossa.

#### **1.4 Diagnosi differenziale della sindrome di Crisponi**

E' probabile che la sindrome di Crisponi sia molto rara al di fuori della Sardegna, tuttavia è possibile che la sua frequenza sia sottostimata. Prima di tutto il fenotipo è stato riconosciuto solo recentemente ed è tuttora poco conosciuto. Secondo, il fenotipo è estremamente complesso ed è facile che alcune delle sue manifestazioni possano non essere diagnosticate correttamente. I tipici episodi parossistici di contrazione tonica muscolare possono essere interpretati a prima vista come manifestazioni epilettiche e spesso sono determinati da stimoli esterni non facilmente riconoscibili. Inoltre esistono varie sindromi con caratteristiche cliniche simili, quali: il tetano del neonato, le paralisi cerebrali secondarie a grave asfissia, l'ipertermia maligna, la sindrome di Isaacs-Mertens, Hyperekplexia o startle disease, la "Stiff baby syndrome", la Sindrome di Stuve-Wiedemann (SWS)/Schwartz-Jampel tipo 2 (SJS2), le

sindromi Cold-induced sweating tipo 1 e 2 (CISS1 e CISS2). Terzo, il numero dei pazienti affetti dalla sindrome è in realtà maggiore dei pochi casi attualmente riportati in letteratura, come evidenziato da comunicazioni personali di nuovi casi in continuo aumento.

In particolare i fenotipi che si osservano nella Sindrome di Stuve–Wiedemann (SWS)/Schwartz-Jampel tipo 2 (SJS2) e nelle sindromi Cold-induced sweating tipo 1 e 2 (CISS1 e CISS2) sono i più simili, e rendono la diagnosi della sindrome di Crisponi non sempre facile.

### **1.4.1 Sindrome di Stuve –Wiedemann/Schwartz-Jampel tipo 2 (SWS/SJS2)**

La Schwartz–Jampel “neonatale” tipo 2 (SJS tipo 2) e la Stuve-Wiedemann (SWS), sono due sindromi che in realtà rappresentano una singola condizione clinicamente e geneticamente omogenea (MIM 601559) dovuta a mutazioni nel gene *LIFR* (*Leukemia Inhibitory Factor Receptor*) (Dagoneau N, et al., 2004). Questa condizione è caratterizzata da fenotipi differenti alla nascita e durante il periodo evolutivo.

#### **Fenotipo neonatale**

Alla nascita sono presenti una curvatura congenita delle ossa lunghe, metafisi ampie e irregolari, contrattura delle grosse articolazioni, camptodattilia, piede equino varo, difficoltà alla suzione ed alla deglutizione, ipertermia, distress respiratorio, dismorfismi facciali, protrusione della bocca. Alcuni pazienti vanno incontro a morte precoce a causa dei problemi respiratori.

#### **Fenotipo in età evolutiva**

I pazienti che sopravvivono presentano bassa statura, ridotta sensibilità al dolore, assenza del riflesso corneale, cheratite, lingua smussa con lacerazioni, anomalie dei denti, fratture spontanee, lordosi e scoliosi, ricorrenti infezioni, intolleranza al caldo, un ritardo nello sviluppo motorio, eccessiva sudorazione in ambiente freddo.

E' interessante notare che alcune caratteristiche cliniche presenti nei pazienti con SWS/SJS2 quali camptodattilia, difficoltà alla suzione ed alla deglutizione, ipertermia, distress respiratorio, dismorfismi facciali, protrusione della bocca, morte precoce, progressiva cifoscoliosi, scarsa regolazione termica con severa intolleranza al calore e sudorazione paradossa, sono state descritte anche nei pazienti affetti da sindrome di Crisponi. Tuttavia alcune anomalie scheletriche, quali inarcamento delle ossa lunghe e metafisi ampie che sono una manifestazione peculiare di SWS/SJS2, non sono mai state descritte nella Sindrome di Crisponi.

#### **1.4.2 Cold-Induced Sweating Syndrome Tipo 1 (CISS1)**

La CISS1 (MIM 272430) è una sindrome causata da mutazioni nel gene *CRLF1* (*cytokine receptor-like factor 1*), descritta per la prima volta nel 1978 in due sorelle israeliane, che fin dall'infanzia sudavano in maniera profusa nella schiena e nel petto quando venivano esposte a temperature tra i 7 e gli 8 gradi C° (Sohar et al., 1978). Esse mostravano inoltre lineamenti dismorfici come arcata del palato alta, incapacità di estendere completamente il gomito e leggera cifoscoliosi. Successivamente sono stati descritti altri tre casi (Knappskog et al., 2003; Hahn et al., 2006) tra cui due fratelli norvegesi, ed un canadese.

##### **Fenotipo neonatale**

La CISS1 è caratterizzata alla nascita da dismorfismi facciali, palato molto arcuato, ridotta forza muscolare facciale, difficoltà nell'alimentazione, che richiede l'utilizzo di un sondino nasogastrico, avversità al cibo.

##### **Fenotipo in età evolutiva**

Durante lo sviluppo, i pazienti presentano cifoscoliosi progressiva che richiede l'intervento chirurgico, limitata estensione dei gomiti e profusa sudorazione in seguito all'esposizione al freddo che si manifestano a circa 7 anni di età.

I dismorfismi facciali, le difficoltà alla suzione ed alla deglutizione, la cifoscoliosi e la sudorazione paradossa sono aspetti fenotipici che si osservano anche nella sindrome di Crisponi, nella quale non sono mai stati osservati tuttavia il palato arcuato, la ridotta forza muscolare e l'avversità al cibo.

### **1.4.3 Cold-induced sweating syndrome Tipo 2 (CISS2)**

La CISS2 (MIM 610313) è causata da mutazioni nel gene *CLCF1* (*cardiotrophin-like cytokine factor 1*) e mostra caratteristiche simili a quelle descritte nella CISS1. Soltanto un caso è stato finora riportato in letteratura (Rousseau et al., 2006), di un australiano esaminato per la prima volta a 46 anni. I sintomi descritti sono difficoltà nell'alimentazione, profusa sudorazione su viso, tronco e arti durante l'esposizione al freddo, incapacità di sudare al caldo. Si osservano inoltre anomalie fisiche congenite quali dismorfismi facciali, palato arcuato, deformità delle ossa lunghe che rendono impossibile la completa distensione degli arti, clinodattilia delle dita delle mani e dei piedi, sindattilia del secondo e terzo dito di entrambi i piedi, scoliosi toracolombare e lordosi lombare, disturbi progressivi delle vertebre cervicali e lombari.

Il fenotipo clinico della CISS2 si sovrappone a quello della Sindrome di Crisponi in alcuni tratti quali le difficoltà nell'alimentazione, la sudorazione paradossa, la scoliosi.

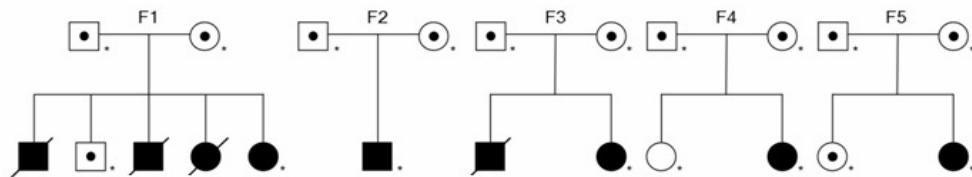
## **2 PROGETTO: Identificazione e caratterizzazione del gene coinvolto nella sindrome di Crisponi**

Obiettivo di questo studio, è stato quello di identificare e caratterizzare il gene coinvolto nella sindrome di Crisponi. Lo studio, approvato dal Comitato Etico della ASL8 di Cagliari, è stato portato avanti in collaborazione con un gruppo di ricercatori tedeschi dell'Università di Colonia, Cologne Center for Genomic (CCG), e dell'Università Children's Hospital di Muenster.

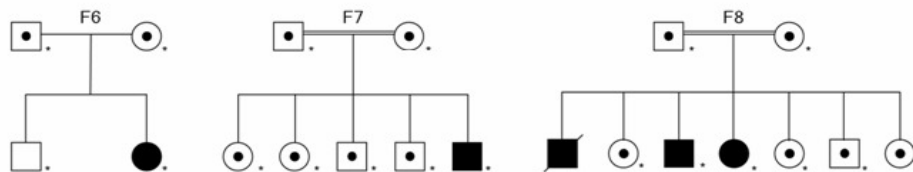
Per condurre l'analisi genetica abbiamo ottenuto, previo consenso informato, campioni di sangue periferico da tutti i componenti delle otto famiglie raccolte per lo studio, cinque sarde e tre turche ma provenienti dalla Germania (Figura 2). Il DNA genomico è stato estratto in accordo con le procedure standard. Purtroppo non è stato possibile recuperare un campione biologico da cui poter estrarre il DNA per i pazienti deceduti.

Inizialmente abbiamo valutato un eventuale coinvolgimento del gene *LIFR*, mutato nella SWS/SJS2, nella patogenesi della sindrome di Crisponi. Nelle famiglie in studio abbiamo condotto un'analisi di linkage utilizzando alcuni microsatelliti presenti nelle vicinanze di questo gene. I risultati di tali analisi ci hanno permesso di escluderne il coinvolgimento nella sindrome.

### Famiglie sarde



### Famiglie turche



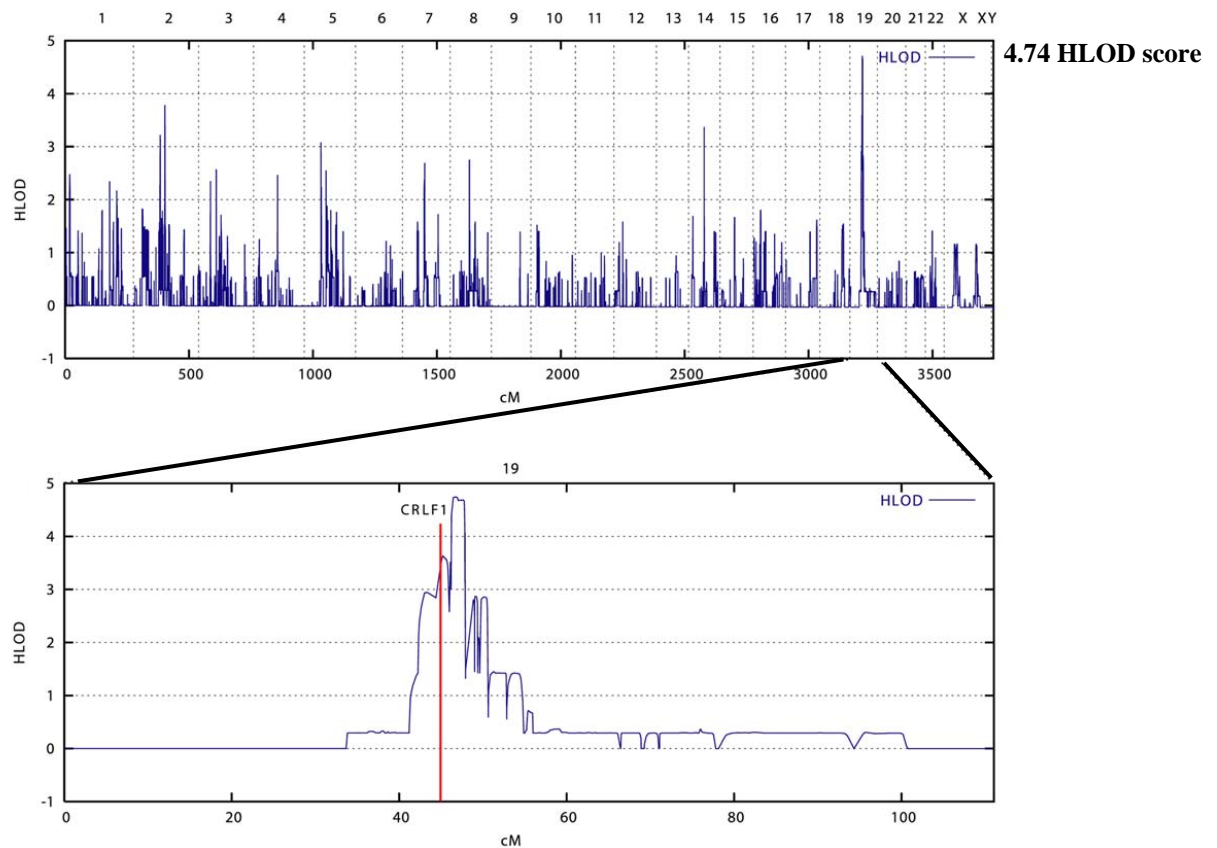
**Figura 2. Alberi genealogici delle cinque famiglie sarde e delle tre turche in studio.** I simboli neri indicano gli individui affetti da Sindrome di Crisponi, i simboli bianchi indicano i non affetti. I simboli con il punto centrale indicano che l'individuo è portatore; i simboli neri barrati indicano individui affetti e deceduti; e l'asterisco(\*) indica che il DNA di quel soggetto è stato analizzato in questo studio.

## 2.1 Genotipizzazione del DNA

Per identificare il gene che sta alla base del disordine, abbiamo avviato un progetto di clonaggio per posizione allo scopo di identificare la regione cromosomica contenente il gene ricercato. La tecnologia all'avanguardia da noi utilizzata, ha previsto la genotipizzazione estesa a tutto il genoma dei pazienti affetti dalla Sindrome di Crisponi, utilizzando polimorfismi a singolo nucleotide (SNPs). Il recente progresso della genomica ha evidenziato come una parte rilevante della variabilità tra individui sia da attribuirsi agli SNPs. Il completamento del sequenziamento del Genoma Umano ha permesso di avere delle stime empiriche sul tasso medio di eterozigosità del DNA e sul numero di SNPs presenti. Ci sarebbero circa 5-6 milioni di SNPs con frequenza dell'allele raro superiore al 10% (SNPs comuni) mentre si arriverebbe a circa 10 milioni di SNPs considerando quelli con frequenza superiore all'1%. Lo studio sistematico di varie patologie attraverso l'utilizzo degli SNPs si sta rivelando particolarmente valido. Gli SNPs sono presenti nel genoma con una densità media di 1 ogni 1300 bp e detengono un potenziale enorme nella strategia di genotipizzazione su larga scala per il mappaggio di geni malattia. Il contenuto informativo è in funzione dell'eterozigosità, della distanza tra i marcatori e della struttura dell'albero genealogico. Anche se ogni SNP è meno informativo di un singolo marcatore microsatellite, il maggior numero di SNPs determina un maggior contenuto informativo in ogni punto del genoma. Il vantaggio di questa tecnologia e' rappresentato dalla velocità, affidabilità e riproducibilità dei risultati utilizzando concentrazioni molto basse di DNA (250 ng per gene-chip). Per lo svolgimento di questo progetto abbiamo utilizzato la piattaforma Affymetrix, con il GeneChip Human Mapping 250K Sty Array, che ha permesso di analizzare più di 238.000 SNPs simultaneamente con una distanza media di 12 Kb.

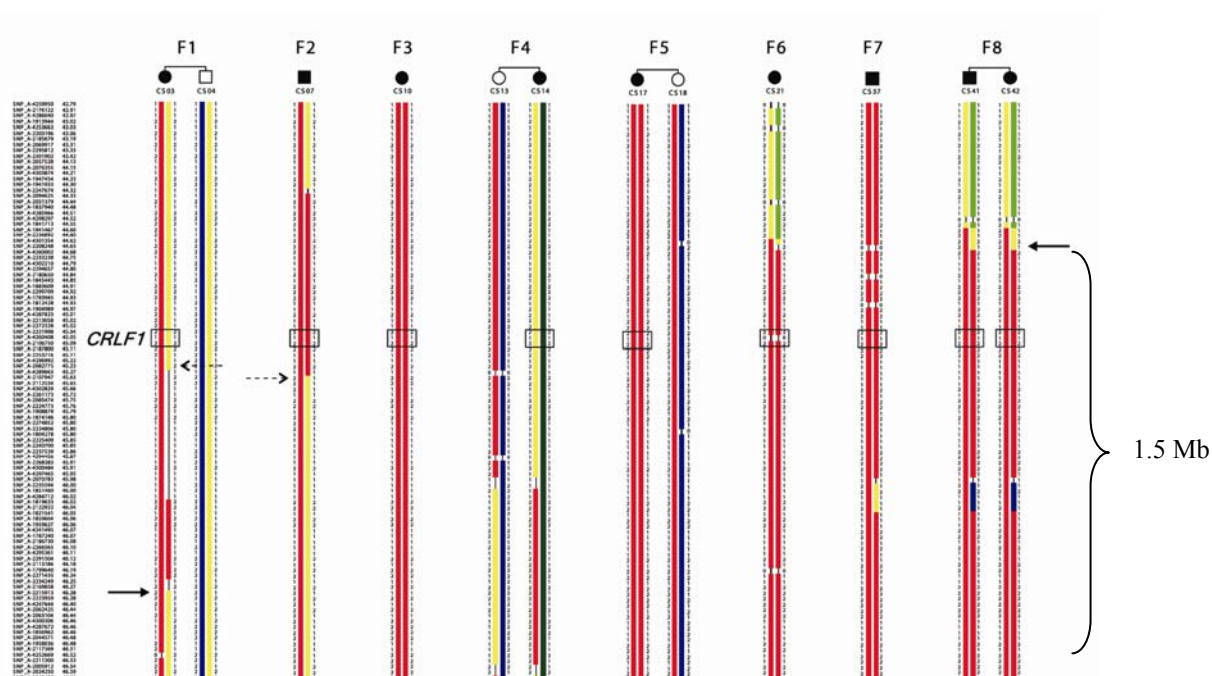
## 2.2 Mappaggio del gene *CRLF1*

L'analisi di linkage sui dati di genotipizzazione è stata fatta assumendo eterogeneità genetica (HLOD) ed ipotizzando legami di consanguineità. Nonostante i genitori dei pazienti sardi non fossero apparentemente imparentati tra di loro (a differenza dei genitori di due famiglie turche), il fatto che alcuni nonni fossero nati nella stessa area rurale e che la sindrome abbia un'incidenza relativamente alta in Sardegna, suggerisce che esista un effetto fondatore per questa malattia, e questo ci ha indotti ad introdurre un legame di consanguineità tra le famiglie per procedere nello studio. Tale analisi di linkage ha rivelato un singolo HLOD score massimo di 4.74 nella regione 19p12-13.1 (Figura 3).



**Figura 3. Mappaggio del locus per la sindrome di Crisponi sul cromosoma 19p12-13.1** (Ref. 17). L'analisi di linkage multipoint è stata condotta con il programma MERLIN utilizzando i dati ottenuti dalla genotipizzazione del DNA di nove soggetti affetti e tre non affetti, con i GeneChip Human Mapping 250K Sty Array dell'Affymetrix. Assumendo eterogeneità genetica (calcolo dell'HLOD), il più alto LOD score di 4.74 è stato ottenuto per i marcatori sul cromosoma 19, in posizione 46,77 cM, in accordo col deCODE map. Nel pannello più in basso è mostrato un ingrandimento di questa regione sul cromosoma 19. La linea rossa indica la posizione del gene *CRLF1*.

Sui dodici soggetti genotipizzati (nove malati e tre sani) abbiamo condotto un'analisi degli aplotipi nella regione 19p12-13.1 per identificare regioni in omozigosi condivise dai probandi delle differenti famiglie (Figura 4). Ciò ha permesso di identificare un intervallo di circa 1,5 Mb con estesa omozigosità, delimitato dagli SNPs rs17711565 e rs2023414. Solo due pazienti (famiglia 1 e 4) non hanno mostrato segmenti in omozigosi negli intervalli considerati, il che suggeriva che in questi casi si trattasse o di composti eterozigoti o di eterogeneità genetica.

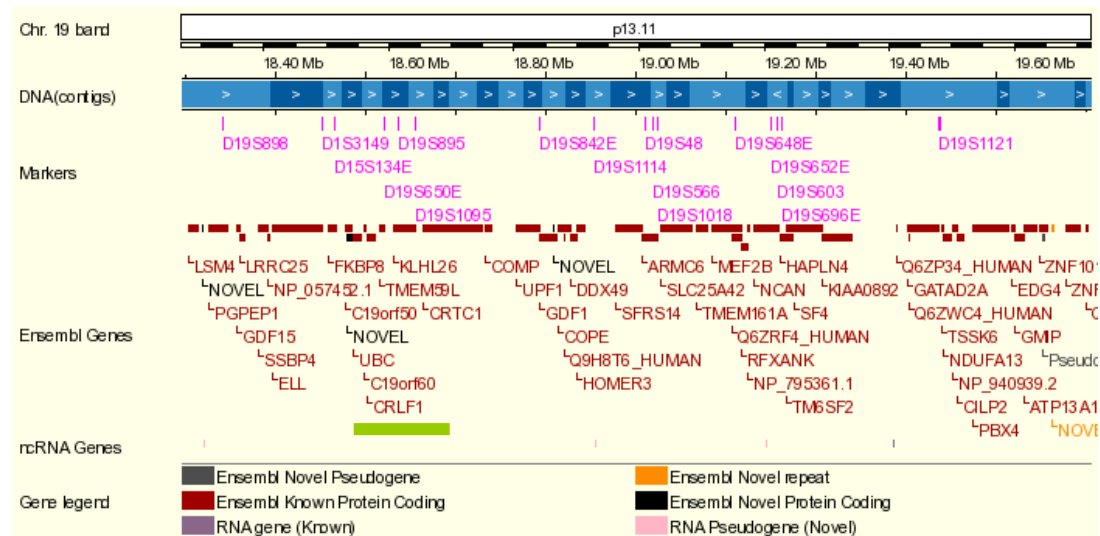


**Figura 4. Analisi degli aplotipi sul cromosoma 19p12-13.1** (Ref. 17). Le regioni in omozigosi che sono ipotizzate essere identiche per discendenza all'interno delle famiglie sono mostrate in rosso. Un intervallo critico di circa 1.5 Mb è definito dalla sovrapposizione di regioni in omozigosi (freccie continue). Solo due pazienti (famiglia 1 e 4) non mostrano un segmento in omozigosi in questo intervallo, suggerendo che vi sia una situazione di composti eterozigoti o di eterogeneità genetica. La posizione del *CRLF1*, il gene più fortemente candidato, è indicata dalla tripletta di SNPs nel riquadro.

All'interno di questo intervallo si trovano numerosi geni, tra cui il *CRLF1* (*cytokine receptor-like factor 1*), che è stato subito considerato il miglior candidato (Figura 5) in quanto recentemente trovato coinvolto nella patogenesi



della sindrome Cold Induced Sweating tipo 1 (CISS1), che mostra, come detto in precedenza, alcuni tratti che si sovrappongono a quelli della Sindrome di Crisponi e della SWS/SJS220 ( Hahn et al., 2006).



**Figura 5 . Regione del cromosoma 19p13.11** di circa 1,5 Mb compresa tra gli SNPs rs17711565 e rs2023414, all'interno della quale si trova il *CRLF1*.

## 2.3 Struttura ed espressione del gene *CRLF1*

Il *CRLF1* è un gene codificato da nove esoni, mappa nella regione cromosomica 19p13.11 ed appartiene alla famiglia dei recettori per le citochine tipo I. L'organizzazione introne/esone del gene *CRLF1* è in accordo con la struttura dei domini della proteina CRLF1. Il primo esone codifica il peptide segnale, l'esone 2 il dominio Ig like, gli esoni 3 e 4 codificano il dominio N-terminale e gli esoni 5 e 6 il dominio C-terminale. Gli esoni 7 e 8 non mostrano omologia con altri membri della famiglia, mentre l'esone 9 contiene il codone di stop.

L'analisi di Northern blot su vari tessuti umani adulti e fetali ha evidenziato l'espressione del trascritto del *CRLF1* di 1.7 Kb, nella milza, nel

timo, nei linfonodi, nell'appendice, nel midollo, nello stomaco, nella placenta, nel cuore, nella tiroide, e nell'ovaio. E' interessante notare che un alto livello di espressione è stato visto anche nel polmone umano fetale (Elson et al. 1998).

## 2.4 Analisi mutazionale del gene *CRLF1*

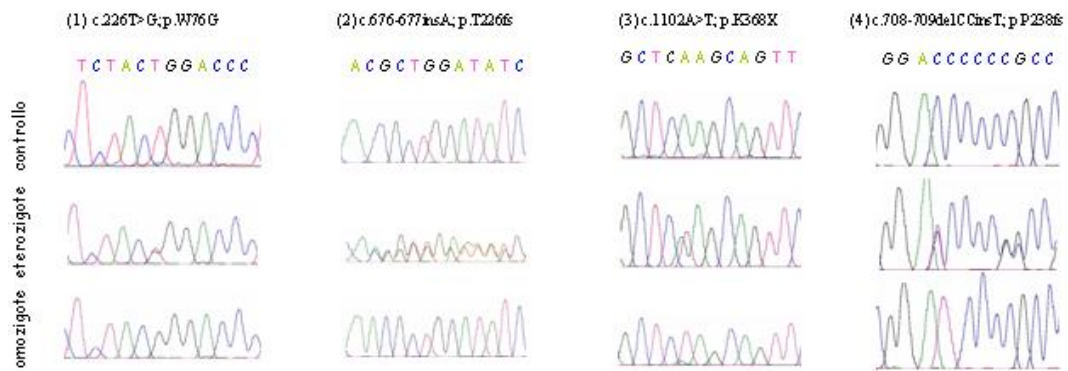
Per verificare il coinvolgimento del gene *CRLF1* nella sindrome di Crisponi, abbiamo condotto un'analisi mutazionale su tutti i nostri pazienti. Dopo aver disegnato nove coppie di primers specifici, abbiamo amplificato tramite PCR i tratti di DNA corrispondenti ai nove esoni codificanti il *CRLF1* (GenBank ref NM\_004750) e comprendenti le regioni introniche fiancheggianti gli esoni stessi (Tabella 1).

Esone	Sequenze dei primers forward	Sequenze dei primers reverse	pb
1	ttagcgcttgtaattcggc	tgtcccccggcgtccagg	394
2	gacaatcattaacagcgtc	agtgtgccacagctcatcc	507
3	ggagatcgagtcaccagcctc	ggcagcctcaggggtgcagac	441
4	cttgaccaacgcggaccct	acttacctacctccctctg	456
5	acagaggcaggttccatc	caggaggtctggttgctcac	250
6	ctaccgagtggaggacagtg	tatgcgacagaatgaggccg	421
7	tcggtccttgagaaacggg	tggagcagtacgcgtgc	252
8	agctcaagcagttcctgg	gggtgtgaacaagacctgc	377
9	ggacaggacacgaatgaagc	cattaagacgcctcacattccc	518

**Tabella 1.** Primers utilizzati per amplificare il gene *CRLF1* e relativa grandezza dei frammenti amplificati.

Utilizzando i medesimi primers abbiamo quindi proceduto al sequenziamento diretto dei tratti di DNA precedentemente amplificati, individuando omozigoti e composti eterozigoti per mutazioni nel gene *CRLF1*,

in tutte le famiglie studiate. Le mutazioni trovate per tutti gli alleli mutanti sono quattro. In particolare le mutazioni sono di vario tipo; nei pazienti sardi abbiamo identificato una mutazione missenso ed una inserzione di un singolo nucleotide, sia in omozigosi che combinate tra loro; nei pazienti turchi una mutazione nonsense ed una inserzione-delezione sempre in omozigosi (Figura 6, Tabella 2).



**Figura 6. Analisi di sequenza del gene *CRLF1*.** Gli elettroferogrammi sono mostrati per ciascuna delle quattro mutazioni trovate in questo studio: gli eterozigoti (in mezzo) e gli omozigoti (in basso) sono paragonati al controllo (in alto).

Sequenziando gli esoni mutati in tutti i membri delle famiglie studiate, abbiamo confermato che le mutazioni co-segregano con la malattia e che tutti i genitori sono eterozigoti. Recentemente abbiamo analizzato il gene *CRLF1* in altri due pazienti con sospetta sindrome di Crisponi, uno italiano ed uno turco, trovando due nuove mutazioni in omozigosi, in particolare due mutazioni missenso affiancate *in cis* nel paziente italiano e una nonsense nel paziente turco (Tabella 2).

Origine	Esone	Variazioni nucleotidiche	Variazioni aminoacidiche	Tipo di mutazione
Sardegna	2	c.226T>G	p.W76G	Missenso
	4	c.676-677insA	p.T226NfsX104	Inserzione
Sardegna	4	c.676-677insA	p.T226NfsX104	Inserzione
Sardegna	4	c.676-677insA	p.T226NfsX104	Inserzione
Sardegna	2	c.226T>G	p.W76G	Missenso
	4	c.676-677insA	p.T226NfsX104	Inserzione
Sardegna	2	c.226T>G	p.W76G	Missenso
Turchia	5	c.708-09delCCinsT	p.P238RfsX6	Del/ins
Turchia	5	c.708-09delCCinsT	p.P238RfsX6	Del/ins
Turchia	7	c.1102A>T	p.K368X	Nonsense
Italia	2	c.[338A>T;341T>C]	p.[N113I;L114P]	Missenso
Turchia	5	c.829C>T	p.R277X	Nonsense

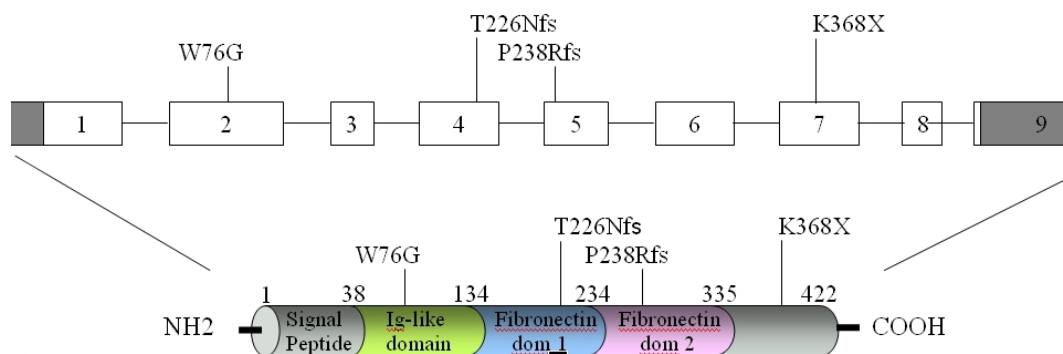
**Tabella 2.** Mutazioni del gene *CRLF1* identificate finora nella nostra coorte di pazienti con sindrome di Crisponi.

Tutte le mutazioni identificate finora sono state analizzate in due diversi pannelli di individui di controllo per le due etnie studiate, (192 sardi e 152 turchi). Analizzando i controlli sardi, abbiamo trovato un soggetto eterozigote per la mutazione p.W76G ed uno per la p.T226NfsX104. Questa frequenza è in linea con l'incidenza relativamente alta della sindrome di Crisponi nella popolazione sarda. Ulteriori studi saranno necessari al fine di valutare correttamente la frequenza dei portatori e l'incidenza della malattia nella popolazione Sarda, a rischio di questo disordine genetico.

## 2.5 Struttura della proteina CRLF1

La proteina CRLF1 (GenBank ref. NP\_004741) è costituita da una struttura di diversi domini che comprende: una sequenza segnale (in posizione 1-37) seguita da un dominio N-terminale Ig-like C2-type (in posizione 38-131), due domini consecutivi fibronectin III-like (in posizione 134-229 e 234-334), ed un dominio C-terminale (in posizione 335-422). Per i primi tre domini sono note strutture proteiche omologhe: per il dominio Ig-like la sequenza con più

alta omologia è stata trovata con un dominio corrispondente alle molecole di adesione delle cellule neurali (NCAM, PDB code 1EPF); per i due domini fibronectina l'omologia più alta si è vista col recettore umano per la prolattina (PDB code 1BP3). Il dominio C-terminale non mostra invece omologie con altri domini funzionali noti (Elson et al. 1998). Il motivo WSEWS in posizione 327 è probabilmente necessario per il corretto ripiegamento ed orientamento della proteina (Bazan J F, 1990).



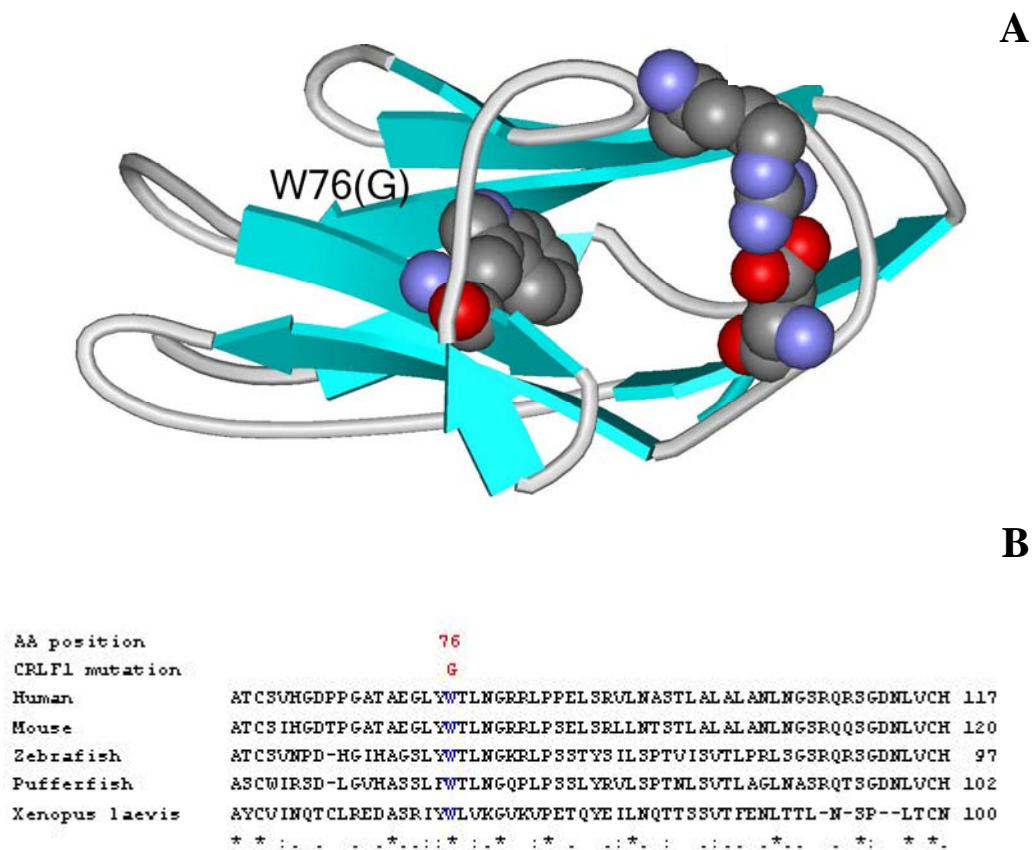
**Figura 7. Mutazioni identificate nel gene *CRLF1*.** In alto struttura del gene con esoni ed introni (le aree più scure alle due estremità indicano le zone 5' e 3' UTR) e in basso struttura della proteina costituita dai suoi domini.

Nelle famiglie turche abbiamo trovato una mutazione (inserzione-delezione) c.708-709delCCinsT nei pazienti CS37 (famiglia 7), CS41 e CS42 (famiglia 8), che porta ad un frameshift nel secondo dominio fibronectina tipo III (p.P238RfsX6) (Figura 7). I padri dei pazienti di queste due famiglie provengono dalla stessa città nell'est della Turchia, il che suggerisce che anche in questo caso ci si trovi di fronte a un effetto fondatore. Nella famiglia 6, proveniente anch'essa dalla Turchia, una mutazione nonsense c.1102A>T è stata trovata nel paziente CS21, che risulta in una fine prematura della proteina troncata (p.K368X, Figura 7).

Nei pazienti sardi, due (CS07 e C10) sono omozigoti per la mutazione c.676-677insA che risulta in un cambiamento da treonina ad asparagina in posizione 266, (p.T226NfsX104) seguita da un frameshift, che conduce alla

completa delezione del dominio fibronectina e del dominio C-terminale (Figura 7); una paziente (CS17) è omozigote per la mutazione missenso c.226T>G (p.W76G), e due pazienti (CS03 e CS14) sono invece composti eterozigoti per entrambe le mutazioni.

La mutazione missenso trovata, c.226T>G risulta in una sostituzione del triptofano con la glicina in posizione 76 del dominio Ig-like (p.W76G). Un'analisi della corrispondente posizione all'interno della struttura tridimensionale della proteina, mostra che il triptofano in posizione 76 è localizzato all'interno della proteina (Figura 8A), e suggerisce che la sua sostituzione con la glicina potrebbe risultare nella diminuzione della stabilità della proteina stessa. Il triptofano in posizione 76 è molto conservato all'interno delle proteine omologhe del CRLF1 nei diversi organismi, come si vede dall'allineamento delle sequenze per varie specie quali topo, zebrafish, pufferfish e *Xenopus laevis* (Figura 8B). Nonostante questa sia una mutazione “apparentemente” più lieve, in realtà è associata ad un fenotipo di sindrome di Crisponi altrettanto severo quanto quello trovato associato ad altre mutazioni apparentemente più gravi.



**Figura 8.** (Ref. 17). **A.** Rappresentazione schematica della struttura tridimensionale della proteina CRLF1 e indicazione della posizione del residuo mutato W76. **B.** Allineamento multiplo delle sequenze degli omologhi del CRLF1 e posizione della mutazione missenso c.226T>G; p.W76G all'interno dell'Ig-like domain. I residui conservati sono indicati in blu.

## 2.6 Ruolo della proteina CRLF1

La proteina CRLF1 è un recettore solubile per le citochine, coinvolta nella via di trasduzione del recettore ciliary neurotrophic factor (CNTF), importante sia per lo sviluppo che per il mantenimento del sistema nervoso (DeChiara et al. 1996).

Le citochine della famiglia dell'interleuchina 6 sono una famiglia di proteine multifunzionali che regolano la crescita e la differenziazione cellulare in diversi sistemi biologici, quali l'immunità, l'ematopoiesi, l'infiammazione e lo sviluppo del sistema nervoso. Questa famiglia comprende diversi elementi tra i quali: leukemia inhibitory factor (LIF), ciliary neurotrophic factor (CNTF) e cardiotrophin-like cytokine factor (CLCF1). Tutte queste citochine condividono, nella formazione dei rispettivi complessi recettoriali, almeno una delle due subunità recettoriali per la trasduzione del segnale: il gp130 o il recettore LIF  $\beta$  (LIFR $\beta$ ).

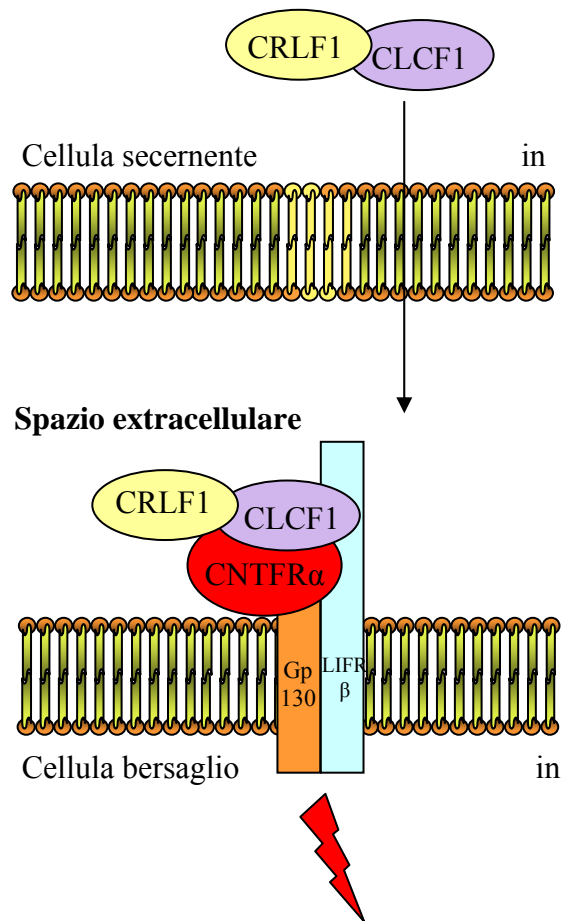
Il CNTF, mostra un limitato spettro di attività, ristretto principalmente agli assi neuromuscolari. Esso promuove la differenziazione e la sopravvivenza di un vasto numero di tipi cellulari nel sistema nervoso. (Perret et al. 2004).

Il CLCF1, supporta la sopravvivenza e lo sviluppo dei motoneuroni *in vitro* ed il suo trascritto è presente nei muscoli scheletrici durante il periodo della massiccia morte cellulare dei motoneuroni. Sebbene il CLCF1 contenga un peptide segnale putativo per la secrezione, affinché tale secrezione sia efficiente è necessaria l'associazione con il recettore della citochina solubile CRLF1 (Rousseau et al. 2006).

Il complesso stabile secreto del CRLF1/CLCF1 forma un ligando per il CNTFR $\alpha$ , che insieme al gp130 e LIFR $\beta$ , forma il complesso recettoriale CNTF (Elson et al. 2000). CRLF1/CLCF1, legando il CNTFR, portano ad una dimerizzazione del gp130/LIFR $\beta$ , che induce così a valle, la via di trasduzione del segnale tramite l'attivazione della via della Janus kinase 1 (JAK1/STAT3) (Figura 9) (Heinrich et al. 1998).



Il CRLF1 e il CLCF1 sono citochine espresse nel tessuto delle ghiandole sudoripare, e attualmente questo complesso è considerato come uno dei più probabili candidati come bersaglio per il fattore di differenziazione colinergica derivato dalle ghiandole sudoripare (Stanke et al. 2006).



**Janus kinase 1/STAT3 pathway**

**Figura 9.** Rappresentazione schematica del complesso recettoriale CRLF1, CLCF1 e CNTFR $\alpha$ .

## 2.7 Analisi funzionale del CRLF1

Il nostro obiettivo è stato quello di definire come la funzione del CRLF1 venga modificata in presenza delle diverse mutazioni, ed in particolare se tali mutazioni siano in grado di alterare il meccanismo di secrezione della proteina stessa e dei suoi partners d'interazione.

Origine	Esone	Variazioni nucleotidiche	Variazioni aminoacidiche	Mutazione	Sindrome
Sardegna	2	c.226T>G	p.W76G	M1	Crisponi (Ref.17)
	4	c.676-677insA	p.T226NfsX104	M2	
Sardegna	4	c.676-677insA	p.T226NfsX104	M2	Crisponi (Ref.17)
Sardegna	4	c.676-677insA	p.T226NfsX104	M2	Crisponi (Ref.17)
Sardegna	2	c.226T>G	p.W76G	M1	Crisponi (Ref.17)
	4	c.676-677insA	p.T226NfsX104	M2	
Sardegna	2	c.226T>G	p.W76G	M1	Crisponi (Ref.17)
Turchia	5	c.708-09delCCinsT	p.P238RfsX6	M3	Crisponi (Ref.17)
Turchia	5	c.708-09delCCinsT	p.P238RfsX6	M3	Crisponi (Ref.17)
Turchia	7	c.1102A>T	p.K368X	M4	Crisponi (Ref.17)
Italia	2	c.[338A>T; 341T>C]	p.[N113I;L114P]		Crisponi
Turchia	5	c.829C>T	p.R277X		Crisponi
Canada	4	c.538C>T	p.Q180X	M5	CISS1 (Ref.8)
	5	c.852G>T	p.W284C	M6	
Norvegia	5	c.844-845delGT	p.V282GfsX47	M7	CISS1 (Ref.8)
Israele	2	c. 242G>A	p.R81H	M8	CISS1 (Ref.8)
	7	c. 1121T>G	p.L374R	M9	

**Tabella 3.** Mutazioni del gene *CRLF1* trovate nella sindrome di Crisponi e nella CISS1.

### 2.7.1 Mutagenesi

Per studiare l'attività del CRLF1 normale e mutato, abbiamo utilizzato un vettore di espressione commerciale, il pCMVXL5 (Origene) contenente l'intero cDNA del *CRLF1*. Su questo clone abbiamo effettuato una mutagenesi sito diretta per le quattro mutazioni trovate associate alla sindrome di Crisponi

(Crisponi et al. 2007) e per le cinque mutazioni che erano state precedentemente descritte per la CISS1 (Hahn et al. 2006) (Tabella 3). I cloni ottenuti per mutagenesi sono stati sequenziati per confermare l'inserzione corretta delle varie mutazioni.

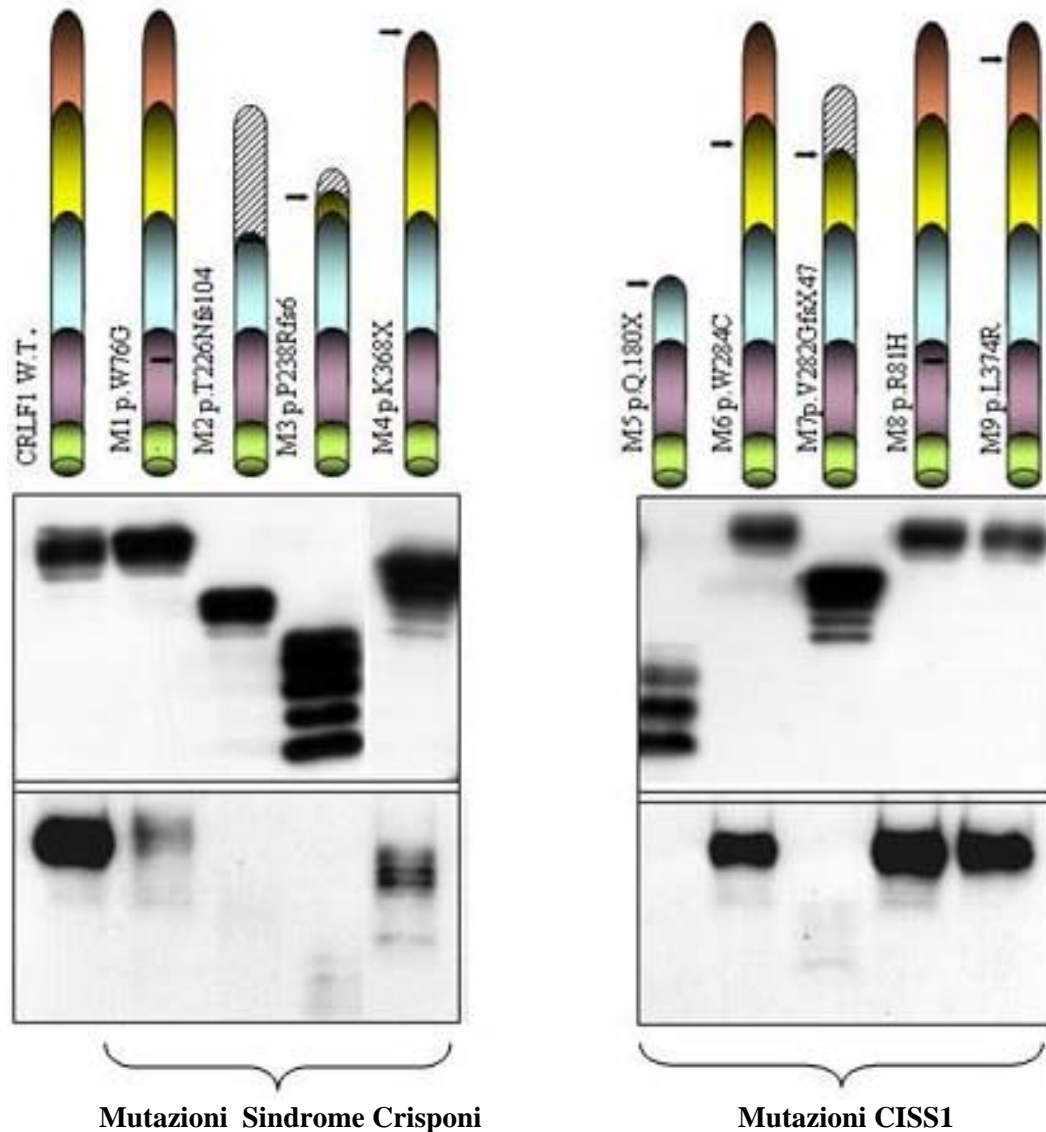
Data la notevole sovrapposizione fenotipica e l'allelismo della sindrome di Crisponi con la CISS1, abbiamo deciso di analizzare tutte le nove mutazioni relative ad entrambe le sindromi, per verificare se ci fossero delle differenze nell'espressione delle diverse proteine mutate, che potessero in qualche modo spiegare le omologie e le differenze che si osservano nei rispettivi fenotipi.

### **2.7.2 Test secrezione**

Dai dati presenti in letteratura, è noto che il CLCF1 viene secreto solo se associato al CRLF1, mentre non è chiaro se il CRLF1 venga secreto anche da solo (Rousseau et al. 2006). Con questo studio ci siamo proposti di stabilire se il CRLF1 normale venisse secreto indipendentemente da CLCF1. Trasfezioni condotte su cellule COS7 con il vettore contenente il cDNA normale del *CRLF1*, e successive analisi di western blot eseguite sia sul lisato cellulare che sul mezzo di coltura con un anticorpo specifico contro il CRLF1, hanno dimostrato che il CRLF1 in realtà viene secreto in maniera autonoma. Successivamente abbiamo testato se le mutazioni presenti nel CRLF1 e responsabili sia della sindrome di Crisponi che della CISS1 ne alterino la sua capacità secretoria. Per far ciò abbiamo trasfettato singolarmente i cDNA che codificano per le nove proteine CRLF1 mutate, in cellule COS7. Anche in questo caso, il terreno di coltura ed i lisati cellulari sono stati analizzati tramite western blot utilizzando un anticorpo specifico diretto contro il CRLF1 (Figura 10). I risultati evidenziano un comportamento variabile per quanto riguarda la secrezione per le varie mutazioni esaminate, in particolare, mostrano che le proteine contenenti le mutazioni M6, M8 e M9 (mutazioni della CISS1), vengono sia espresse che secrete, le proteine contenenti le mutazioni M1 e M4 (mutazioni della sindrome di Crisponi), sono espresse ma con una parziale riduzione nella secrezione, mentre le proteine contenenti le mutazioni M2, M3

(mutazioni della sindrome di Crisponi), M5 e M7 (mutazioni della CISS1), vengono espresse ma non secrete.

Ulteriori studi saranno necessari per cercare di chiarire la differenza fenotipica tra le due sindromi e la correlazione genotipo/ fenotipo.



**Figura 10. Studi funzionali per le quattro mutazioni del CRLF1 trovate nella sindrome di Crisponi e per le cinque descritte nella CISS1 (Tabella 3).** Western blotting con l'anticorpo specifico per il CRLF1: in alto lisati cellulari di cellule COS-7 trasfettate con costrutti esprimenti la forma wild type del CRLF1 e le varie mutazioni - come indicato -; in basso il terreno di coltura delle stesse cellule trasfettate. Le mutazioni M6, M8 e M9 vengono sia espresse che secrete; le mutazioni M1, M4 sono espresse ma con una parziale riduzione nella secrezione; M2, M3, M5 e M7 vengono espresse ma non secrete.

### 3 RISULTATI E DISCUSSIONE

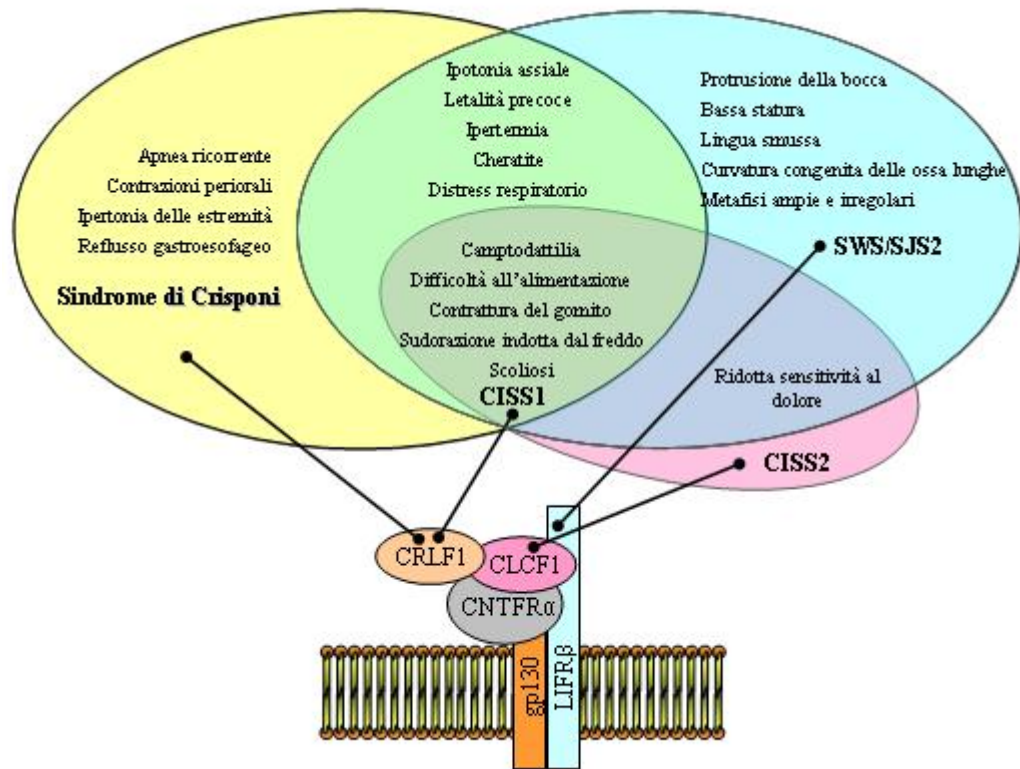
Con questo studio abbiamo dimostrato che mutazioni nel gene *CRLF1* sono responsabili della sindrome di Crisponi e, in questo modo siamo stati in grado di provare allelismo con la CISS1.

Sebbene presenti nello stesso gene, le diverse mutazioni associate alla CISS1 sono state riportate essere associate ad un fenotipo meno severo rispetto a quello della Sindrome di Crisponi. In studi più recenti, (Dagoneau et al. 2007), hanno riportato indipendentemente che mutazioni nel *CRLF1* causano la sindrome di Crisponi. Gli autori suggeriscono che mutazioni apparentemente più severe quali mutazioni nonsense siano associate alle manifestazioni più gravi presenti nel fenotipo neonatale della Sindrome di Crisponi, mentre mutazioni più lievi quali mutazione missenso siano associate ad un fenotipo più lieve, per esempio quello associato alla CISS1. In contrasto con le loro osservazioni, noi abbiamo trovato che al momento non esiste una chiara correlazione genotipo/fenotipo sia per il tipo che per il sito d'azione delle mutazioni nel *CRLF1*. In particolare, abbiamo trovato che la mutazione missenso (c.226T>G; p.W76G), in omozigosi nella paziente sarda CS17 della famiglia 5, è associata ad un fenotipo altrettanto, se non addirittura ancor più severo, di quello trovato negli altri pazienti con sindrome di Crisponi che presentano mutazioni nonsense o frameshift. Le distinzioni sono ulteriormente complicate dalla frequente presenza della combinazione di diverse mutazioni in alcuni casi di ciascuna sindrome. I risultati dell'analisi funzionale sulle proteine mutate hanno messo in evidenza delle importanti differenze che esistono tra le varie mutazioni. Dimostrando che la mutazione missenso trovata nella sindrome di Crisponi (M1), viene secreta in quantità molto inferiore rispetto alla proteina normale, abbiamo evidenziato che nonostante si tratti di una mutazione puntiforme, essa si comporta, almeno riguardo al meccanismo di secrezione, in maniera paragonabile a mutazioni importanti come quelle che provocano frameshift e che producono proteine tronche molto più corte della proteina normale. Questo risultato si ritrova in accordo, ancora una volta, con il

fatto che nella paziente che porta in omozigosi tale mutazione missenso, si osserva un fenotipo più grave che negli altri.

Il CRLF1 ed il CLCF1 sono citochine espresse nel tessuto delle ghiandole sudoripare, ed attualmente questo complesso è uno dei più probabili candidati come fattore di differenziazione colinergica delle ghiandole sudoripare (Stanke et al. 2006). E' pertanto probabile che nella sindrome di Crisponi, così come nella CISS1 e nella CISS2, le funzioni periferiche sudomotorie siano alterate in maniera simile, causando la sudorazione paradossa osservata. Oltre alle ghiandole sudoripare, ci sono altri due elementi bersaglio che sono innervati dai neuroni simpatici colinergici; la vascolarizzazione dei muscoli scheletrici e il periosteo (Francis et al 1999). E' stato dimostrato (Asmus et al. 2001) che gli osteoblasti immaturi rilasciano uno o più fattori solubili della famiglia delle citochine neuropoietiche, che inducono la differenziazione colinergica in neuroni simpatici. Sia i fattori di differenziazione delle ghiandole sudoripare che quelli periosteali, trasducono il segnale attraverso il LIFR $\beta$  e sono membri della famiglia delle citochine neuropoietiche. Tuttavia questo meccanismo non è ancora completamente definito.

Sarà importante determinare se il CRLF1 sia il fattore di differenziazione colinergico a lungo ricercato che altera le proprietà di trasmissione dell'innervazione simpatica delle ghiandole sudoripare e del periosteo durante lo sviluppo. Il complesso stabile secreto del CRLF1/CLCF1 forma un ligando per il CNTFR $\alpha$ , che insieme al gp130 e LIFR $\beta$ , forma il complesso recettoriale CNTF (Elson et al. 2000). CRLF1/CLCF1, legando il CNTFR $\alpha$ , portano ad una dimerizzazione del gp130/LIFR $\beta$ , che induce così a valle, la via di trasduzione del segnale tramite l'attivazione della via della Janus kinase 1 (JAK1/STAT3) (Heinrich et al. 1998). In un modello murino knock-out per il *Crlf1*, (Alexander et al. 1999) l'inattivazione del gene determina l'inabilità alla suzione e i topi muoiono di fame qualche giorno dopo la nascita, caratteristica peculiare questa anche della sindrome di Crisponi e delle altre sindromi simili analizzate. Dal momento che il recettore CNTF ha diversi ligandi ma una comune via del segnale a valle, la sovrapposizione fenotipica tra sindrome di Crisponi, CISS1, CISS2 e SWS/SJS2 può essere razionalizzata (Figura. 11).



**11. Famiglia di disordini associati al recettore CNTF.** Sovrapposizione fenotipica della sindrome di Crisponi, CISS1, CISS2, e SWS/SJS2.

I risultati di questo studio ci hanno permesso di dimostrare la presenza di allelismo tra la sindrome di Crisponi e la CISS1, tuttavia rimane ancora da chiarire se si tratti di due entità cliniche distinte o di un singolo disordine con un grado variabile di espressione fenotipica. Finora non è stata osservata alcuna chiara correlazione genotipo/fenotipo per il tipo o la localizzazione delle mutazioni nel *CRLF1* nei pazienti con sindrome di Crisponi e CISS1. Pertanto altri difetti o varianti ancora sconosciute, potrebbero essere responsabili della variabile espressione fenotipica delle mutazioni del *CRLF1*. Sarà necessario inoltre rivalutare criticamente il fenotipo clinico delle due sindromi alla luce di queste scoperte. Ulteriori studi funzionali sulle proteine CRLF1 mutate saranno necessari per definire il loro ruolo nella patogenesi delle due sindromi.

## **4 MATERIALI E METODI**

### **4.1 Estrazione del DNA**

Per l'estrazione del DNA, abbiamo utilizzato il metodo di estrazione salina che prevede la lisi osmotica dei globuli rossi ed il successivo isolamento delle cellule nucleate dal campione. I leucociti così isolati vengono trattati con un tampone di lisi per i globuli bianchi, contenente SDS e proteinasi K, allo scopo di estrarre gli acidi nucleici e degradare le proteine presenti che vengono poi eliminate con precipitazione salina. Il DNA genomico viene quindi precipitato con isopropanolo, risospeso nell'apposito tampone ed un'aliquota viene caricata su gel d'agaroso 0.8% per poterne valutare la concentrazione.

### **4.2 Genotipizzazione del DNA**

La genotipizzazione dei campioni di DNA di nove soggetti affetti da sindrome di Crisponi con nota o sospetta consanguineità, e tre non affetti, è stata effettuata con la piattaforma Affymetrix, utilizzando i GeneChip Human Mapping 250K Sty Array. Per questi array è stato usato l'enzima di restrizione Sty I come primo passo nella preparazione del campione (protocollo Affymetrix). I dati di genotipizzazione sono stati analizzati usando il GeneChip DNA Analysis Software (GDAS v3.0, Affymetrix). Per escludere errori di genotipizzazione, è stato verificato il sesso di ogni campione contando gli SNPs eterozigoti per il cromosoma X. Eventuali errori di relazioni parentali sono stati valutati con l'aiuto del programma Graphical Relationship Representation (Abecasis et al. 2001). Gli errori non mendeliani sono stati identificati usando il programma MERLIN (Abecasis et al. 2002) e sono stati eliminati i genotipi non verosimili. Le analisi di linkage parametrico sono state effettuate per mezzo dei programmi ALLEGRO (Gudbjartsson et al. 2000) e di una nuova versione di MERLIN (Abecasis et. Al 2002, Abecasis et al. 2005). Gli aplotipi sono stati



ricostruiti attraverso una versione modificata del programma GENEHUNTER 2.1 (Kruglyak et al. 1996, Strauch et al. 2000) e presentati graficamente con HaploPainter (Thiele et al. 2005). Tutti i dati sono stati trattati usando the graphical user interface ALOHOMORA (Rüschendorf et al. 2005).

### **4.3 Amplificazione del DNA e sequenziamento diretto**

L' amplificazione del DNA è stata eseguita mediante PCR (polymerase chain reaction). Le reazioni di PCR sono state condotte in 25 µl di volume finale, utilizzando 6 ng di DNA genomico, 64 mM di dinucleotide trifosfato, 16 pmol di ogni primer e 0.75 U di Taq polimerase (Invitrogen). Per gli esoni 1, 7 e 8, particolarmente ricchi in contenuto GC, si è reso necessario l'utilizzo di 1M di betaina (Sigma Aldrich) (Tabella 2). La concentrazione finale dei primers è di 50 picomoli sia per i primers forward che per i primers reverse. Il file di amplificazione è 95°C 5' (95°C 30"-TM°C 45"-72°C 1') x 35 cicli . La TM varia per le diverse coppie di primers utilizzate. Un'aliquota della PCR viene controllata su gel d'agaroso 1%, il resto viene purificato tramite reazione enzimatica utilizzando l'Exosap (USB), e poi sequenziato. Le reazioni di sequenza sono state fatte in 10 µl di volume finale, utilizzando 2 µl di PCR purificata e 1 µl di BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystem). Lo strumento utilizzato è il sequenziatore ABI PRISM 3130 Applied Biosystem.

### **4.4 Mutagenesi**

Il vettore pCMV6-XL5 (Origene) contenente il cDNA che codifica il CRLF1 umano è stato sottoposto a mutagenesi sito specifica per mezzo del Quik Change Site Directed Mutagenesis kit (Stratagene) come da protocollo, utilizzando l'enzima Pfu Turbo DNA polimerase. Per ogni mutazione da inserire sono state disegnate coppie di primers contenenti la mutazione in esame. Il plasmide usato come stampo (privo di mutazione) è stato eliminato per digestione enzimatica con l'enzima di restrizione Dpn1, specifico per il DNA metilato. I costrutti così ottenuti sono stati trasfettati in cellule batteriche

(XL1Blue) e i cloni isolati sono stati sequenziati per verificare la mutagenesi sito diretto.

## **4.5 Trasfezioni**

I cDNA codificanti il CRLF1 normale ed i CRLF1 mutanti sono stati trasfettati in cellule COS7. 24 ore prima della trasfezione le cellule sono state trasferite in piastre da 35mm in quantità tale che dopo 24 ore la confluenza fosse del 90%. Il metodo di trasfezione utilizzato (Lipofectamina 2000, Invitrogen) sfrutta la proprietà di lipidi cationici di legare il DNA carico negativamente, e di veicolarlo dentro la cellula grazie alla capacità dei lipidi di fondersi con la membrana cellulare fosfolipidica. Il terreno di coltura utilizzato durante la trasfezione deve essere privo di penicillina e streptomicina, che interferiscono con l'assorbimento dei liposomi da parte della membrana citoplasmatica. Dopo 72 ore dalla trasfezione, i supernatanti sono stati recuperati e le cellule lavate con PBS, staccate meccanicamente dalle piastre tramite un cell lifter (Corning), e lisate nel buffer di lisi contenente 50 mM Tris HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% Brij96 più inibitori di proteasi (Elson et al. 2000).

## **4.6 Western blotting**

Dopo la trasfezione, 50 µg di lisati proteici e 25 µl di supernatanti sono stati caricati su un gel SDS-PAGE. La corsa elettroforetica è stata effettuata in condizioni denaturanti, che consentono la separazione delle proteine in base al peso molecolare e alla carica. Le proteine sono state quindi trasferite dal gel ad una membrana di PVDF (Hybond P, Amersham) sfruttando una differenza di potenziale elettrico di 100V applicata per 1 ora a 4°C; utilizzando un buffer di trasferimento contenente glicina, trizma base e metanolo. Dopo il trasferimento la membrana è stata lavata velocemente in PBS pH 7.4, quindi trasferita in una soluzione di PBS pH 7.4 contenente tween ad una concentrazione dello 0.1 % (PBS-T) e latte in polvere Biorad (5% w/v) e tenuta in agitazione per 1 ora a

temperatura ambiente, al fine di bloccare i gruppi reattivi presenti. Dopo il bloccaggio si è proceduto con l'ibridazione con l'anticorpo primario specifico anti CRLF1 (Abnova). Successivamente abbiamo effettuato due lavaggi veloci e tre lavaggi di 15' in PBS-T, incubato per 1 ora a temperatura ambiente in una soluzione di PBS-T contenente l'1% di latte in polvere e l'anticorpo secondario coniugato con la horseradish peroxidase (HRP) (Santacruz). Dopo un'altra serie di lavaggi come i precedenti, abbiamo proceduto alla rivelazione effettuata utilizzando il kit Amersham ECL-plus, secondo il protocollo indicato. La rivelazione consiste nell'applicazione del substrato chemiluminescente sulla membrana e nella successiva esposizione su lastra autoradiografica.

## **5 PROSPETTIVE FUTURE**

### **5.1 Diagnosi molecolare e prenatale**

A breve termine i risultati della nostra ricerca hanno consentito di sviluppare i reagenti necessari per effettuare una diagnosi molecolare. Ciò permette attualmente di eseguire sia una diagnosi differenziale con altre sindromi con caratteristiche cliniche simili, sia un'eventuale diagnosi prenatale.

### **5.2 Studio pilota per lo screening genetico della sindrome di Crisponi nella popolazione Sarda**

In seguito alla pubblicazione del presente studio, abbiamo ricevuto diverse segnalazioni di pazienti con sospetta sindrome di Crisponi. Questo lascia pensare che l'incidenza della sindrome sia attualmente sottostimata e che si tratti di una patologia meno rara di quanto si creda. Quello che ci proponiamo quindi, è di intraprendere uno studio pilota per lo screening genetico della sindrome di Crisponi, al fine di valutare la frequenza dei portatori e l'incidenza

della malattia nella popolazione Sarda, particolarmente a rischio per questa patologia.

### **5.3 Terapia farmacologica della sindrome di Crisponi**

La sindrome di Crisponi non può essere ad oggi controllata attraverso terapie specifiche, e le cure si limitano al trattamento di alcuni sintomi, quando ciò è possibile. Tuttavia è noto dalla letteratura che la CISS1 può essere trattata con farmaci agonisti dei recettori  $\alpha_2$  adrenergici come la clonidina (Hahn et al.2006). La somministrazione di questo farmaco è in grado di abolire la sudorazione anormale in pochi giorni con effetti collaterali minori quali effetto sedativo, calo di concentrazione, bocca asciutta e vertigini ortostatiche. Il controllo dei sintomi e una riduzione degli effetti collaterali così tollerati è stato raggiunto con la combinazione di clonidina (0.1 mg 4 volte al giorno), e amitriptilina (da 50 a 100 mg al giorno). Riducendo le dosi, i sintomi ricompaiono immediatamente. Dal momento che i sintomi che sembrano migliorare nella CISS1 sono gli stessi che si osservano nella sindrome di Crisponi è possibile che lo stesso trattamento possa essere applicato con successo anche ai nostri pazienti e sarà interessante vagliare questa possibilità nel prossimo futuro.

## **6 CONCLUSIONI**

In conclusione, abbiamo identificato le basi molecolari della sindrome di Crisponi e trovato quattro diverse mutazioni nel *CRLF1* in cinque famiglie sarde e tre turches. Questi risultati ci hanno permesso di dimostrare l'allelismo tra la sindrome di Crisponi e la CISS1. Sebbene esistano delle differenze nella severità delle due sindromi, ci sono considerevoli sovrapposizioni fenotipiche tra loro e alcune somiglianze con altre sindromi correlate al recettore CNTF (CISS2 e SWS/SJS2). Abbiamo quindi proposto una nuova famiglia di sindromi, chiamata "Disordini correlati al recettore CNTF", di cui la sindrome di Crisponi sarebbe la sua componente più recente.

Riteniamo importante che questo studio continui e in particolare che si determini la frequenza esatta di questa malattia, che attualmente è sicuramente sottostimata per diverse ragioni. Prima di tutto il fenotipo è stato riconosciuto solo recentemente ed è tuttora poco conosciuto. Secondo, il fenotipo è estremamente complesso ed è facile che alcune delle sue manifestazioni possano non essere diagnosticate correttamente. Terzo, il numero dei pazienti affetti dalla sindrome è in realtà maggiore dei pochi casi attualmente riportati in letteratura come evidenziato da comunicazioni personali di nuovi casi in continuo aumento.

A breve termine i risultati della nostra ricerca hanno consentito di sviluppare i reagenti necessari per effettuare una diagnosi molecolare. In futuro la definizione della via fisio-patologica del gene coinvolto, attraverso lo studio funzionale del suo prodotto proteico e lo studio di modelli murini per tale sindrome, forniranno importanti informazioni che potrebbero essere utili per lo sviluppo di terapie specifiche per la sindrome ed eventualmente anche per patologie ben più frequenti.

## **7 RINGRAZIAMENTI**

Questo progetto è stato realizzato grazie al lavoro di una squadra di cui sono orgogliosa di far parte.

Ringrazio dunque:

Mara Marongiu, Francesca Chiappe, Manila Deiana, Gianluca Usala, Manuela Uda, Marco Masala, per tutto il lavoro fatto insieme e per essermi amici.

Laura Crisponi per avere avuto fiducia in me, per avermi dato l'opportunità di lavorare a questo progetto, sia a Cagliari che a Colonia, e per aver condiviso con me gioie e dolori legati alla realizzazione di questo lavoro.

Ringrazio inoltre:

il Prof. Antonio Cao per il sostegno dimostratoci in questi ultimi, difficili anni,  
il Prof. Peter Nürnberg per avermi “accolto” al CCG di Colonia.

Grazie ad Alen e Lu, per avermi fatto sentire a casa nei mesi passati in Germania.

Alla mia famiglia, e soprattutto a Riccardo, per avermi sempre sostenuto e appoggiato, con infinita pazienza, nella mia corsa in questo desiderio “pazzo” di realizzarmi nella ricerca.

Un ringraziamento particolare va al Dott. Giangiorgio Crisponi e a tutti i componenti delle famiglie in studio, che con la loro continua e generosa attività e partecipazione hanno reso possibile la realizzazione di questo lavoro.

E grazie infine, al Dott. Giuseppe Pilia, per avermi trasmesso tutto l’entusiasmo con cui affrontava questo lavoro, per avermi sostenuto, quando ne avevo bisogno, dicendomi che “il fatto di sentirsi inadeguati è un sentimento comune a chi sente la responsabilità del proprio lavoro e di conseguenza fa del proprio meglio per migliorarsi. Niente è gratis” e per avermi detto ciò che continuo a ripetermi e cioè che “nella ricerca se dai dieci, ottieni dieci” (spero tanto sia così!).

Questo lavoro è stato reso possibile grazie al supporto della “Associazione sindrome di Crisponi e Malattie Rare ONLUS” ed alla Regione Autonoma della Sardegna.

## 8 BIBLIOGRAFIA

1. Crisponi G (1996) "Autosomal recessive disorder with muscle contractions resembling neonatal tetanus, characteristic face, camptodactyly, hyperthermia, and sudden death: a new syndrome?" *Am J Med Genet* 62:365-71
2. Accorsi P, Giordano L, Faravelli F (2003) "Crisponi syndrome: report of a further patient". *Am J Med Genet A* 123:183-5
3. Nannenberg EA, Bijlmer R, Van Geel BM, Hennekam RC (2005) "Neonatal paroxysmal trismus and camptodactyly: the Crisponi syndrome". *Am J Med Genet A* 133:90-2
4. Dagoneau N, Scheffer D, Huber C, Al-Gazali LI, Di Rocco M, Godard A, Martinovic J, Raas-Rothschild A, Sigaudy S, Unger S et al (2004) "Null leukemia inhibitory factor receptor (LIFR) mutations in Stuve-Wiedemann/Schwartz-Jampel type 2 syndrome". *Am J Hum Genet* 74:298-305
5. Sohar E, Shoenfeld Y, Udassin R, Magazanik A, Revach M (1978) "Cold-induced profuse sweating on back and chest. A new genetic entity?" *Lancet* 2:1073-4
6. Knappskog PM, Majewski J, Livneh A, Nilsen PT, Bringsli JS, Ott J, Boman H (2003) "Cold-induced sweating syndrome is caused by mutations in the CRLF1 gene". *Am J Hum Genet* 72:375-83
7. Rousseau F, Gauchat JF, McLeod JG, Chevalier S, Guillet C, Guilhot F, Cognet I, Froger J, Hahn AF, Knappskog PM et al (2006) "Inactivation of cardiotrophin-like cytokine, a second ligand for ciliary neurotrophic factor receptor, leads to cold-induced sweating syndrome in a patient". *Proc Natl Acad Sci USA* 103:10068-73
8. Hahn AF, Jones DL, Knappskog PM, Boman H, McLeod JG (2006) "Cold-induced sweating syndrome: a report of two cases and demonstration of genetic heterogeneity". *J Neurol Sci* 250:62-70

9. Elson GCA, Graber P, Losberger Ch, Herren S, Gretener D, Menoud LN, Wells TNC, Kosco-Vilbois MH, Gauchat J-F (1998) "Cytokine-like factor-1, a novel soluble protein, shares homology with members of the cytokine type I receptor family". *J Immunol* 161:1371-1379
10. Bazan J F (1990) "Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily". *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 6934-6938
11. DeChiara TM, Vejsada R, Poueymirou WT, Acheson A, Suri C, Conover JC, Friedman B, McClain J, Pan L, Stahl N et al (1995) "Mice lacking the CNTF receptor, unlike mice lacking CNTF, exhibit profound motor neuron deficits at birth". *Cell* 83:313-22
12. Perret D, Guillet C, Elson G, Froger J, Favreau H P, Rousseau F, Chabbert M, Gauchat J F, and Gascan H (2004) "Two different Contact Sites Are Recruited by Cardiotrophin-like Cytokine (CLC) to Generate the CLC/CLF and CLC/sCNTFR $\alpha$  Composite Cytokines". *J Biological Chemistry* 279: 43961-43970
13. Elson GC, Lelievre E, Guillet C, Chevalier S, Plun-Favreau H, Froger J, Suard I, de Coignac AB, Delneste Y, Bonnefoy JY et al (2000) "CLF associates with CLC to form a functional heteromeric ligand for the CNTF receptor complex". *Nat Neurosci* 3:867-72
14. Heinrich PC, Behrmann I, Muller-Newen G, Schaper F, Graeve L (1998) "Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway". *Biochem J* 334:297-314 Review
15. Dagoneau N, Bellais S, Blanchet P, Sarda P, Al-Gazali LI, Di Rocco M, Huber C, Djouadi F, Le Goff C, Munnich A, Cormier-Daire V. (2007) "Mutations in cytokine receptor-like factor 1 (CRLF1) account for both Crisponi and cold-induced sweating syndromes". *Am J Hum Genet.* 80:966-70
16. Stanke M, Duong CV, Pape M, Geissen M, Burbach G, Deller T, Gascan H, Otto C, Parlato R, Schutz G et al (2006) "Target-dependent specification of the neurotransmitter phenotype: cholinergic differentiation of sympathetic neurons is mediated in vivo by gp 130 signalling". *Development* 133:141-50



17. Crisponi L, Crisponi G, Meloni A, Toliat M R, Nürnberg G, Usala G, Uda M, Masala M, Höhne W, Becker C, Marongiu M, Chiappe F, Kleta R, Rauch A, Wollnik B, Strasser F, Reese T, Jakobs C, Kurlemann G, Cao A, Nürnberg P, Rutsch F ( 2007) “Crisponi syndrome is caused by mutations in the CRLF1 gene and is allelic to cold-induced sweating syndrome type 1”. *Am J Hum Genet* 80: 971-981
18. Francis NJ, Landis SC (1999) “Cellular and molecular determinants of sympathetic neuron development”. *Annu Rev Neurosci* 22:541-66 Review
19. Asmus SE, Tian H (2001) “Induction of cholinergic function in cultured sympathetic neurons by periosteal cells: cellular mechanisms”. *Dev Biol* 235:1-11
20. Alexander WS, Rakar S, Robb L, Farley A, Willson TA, Zhang JG, Hartley L, Kikuchi Y, Kojima T, Nomura H et al (1999) “Suckling defect in mice lacking the soluble haemopoietin receptor NR6”. *Curr Biol* 9:605-8
21. Abecasis GR, Cherny SS, Cookson WO, Cardon LR (2001) “GRR: graphical representation of relationship errors”. *Bioinformatics* 17: 742-743
22. Abecasis GR, Cherny SS, Cookson WO, Cardon LR (2002) “Merlin – rapid analysis of dense genetic maps using sparse gene flow trees”. *Nat Genet* 30:97-101
23. Abecasis GR, Wigginton JE (2005) “Handling marker-marker linkage disequilibrium: pedigree analysis with clustered markers”. *Am J Hum Genet* 77:754-67
24. Gudbjartsson DF, Jonasson K, Frigge ML, Kong A (2000) “Allegro, a new computer program for multipoint linkage analysis”. *Nat Genet* 25:12-13
25. Kruglyak L, Daly MJ, Reeve-Daly MP, Lander ES (1996) “Parametric and nonparametric linkage analysis: a unified multipoint approach”. *Am J Hum Genet* 58:1347-1363
26. Strauch K, Fimmers R, Kurz T, Deichmann KA, Wienker TF, Baur MP (2000) “Parametric and nonparametric multipoint linkage analysis with imprinting and two locus-trait models: application to mite sensitization”. *Am J Hum Genet* 66:1945-1957

27. Thiele H, Nürnberg P (2005) HaploPainter: “a tool for drawing pedigrees with complex haplotypes”. *Bioinformatics* 21:1730-2
28. Rüschemdorf F, Nürnberg P (2005) “ALOHOMORA: a tool for linkage analysis using 10K SNP array data”. *Bioinformatics* 21:2123-5